



(11) Numéro de publication : **0 614 978 A1**

(12) **DEMANDE DE BREVET EUROPEEN**

(21) Numéro de dépôt : **94400492.8**

(22) Date de dépôt : **08.03.94**

(51) Int. Cl.<sup>5</sup> : **C12N 15/12, C07K 13/00,  
C12N 15/85, C12N 5/10,  
C12P 21/08, C12P 21/02,  
G01N 33/577, A61K 37/02**

(30) Priorité : **09.03.93 FR 9302675**

(43) Date de publication de la demande :  
**14.09.94 Bulletin 94/37**

(84) Etats contractants désignés :  
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL PT  
SE**

(71) Demandeur : **ROUSSEL-UCLAF**  
**35, Boulevard des Invalides**  
**F-75007 Paris (FR)**

(71) Demandeur : **THE GENERAL HOSPITAL**  
**CORPORATION**  
**55 Fruit Street**  
**Boston, MA 02114 (US)**

(72) Inventeur : **Aruffo, Alejandro**  
**1012 Spruce Street**  
**Edmonds, Washington 98020 (US)**  
Inventeur : **Seed, Brian**  
**47A Joy Street**  
**Boston 02114 Massachusetts (US)**  
Inventeur : **Fridman, Wolf H.**  
**27, rue Berthollet**  
**F-75005 Paris (FR)**  
Inventeur : **Sautas, Catherine**  
**27, rue Berthollet**  
**F-75005 Paris (FR)**  
Inventeur : **Teillaud, Christophe**  
**117, Boulevard de l'Hopital**  
**F-75013 Paris (FR)**  
Inventeur : **Teilland, Jean-Luc**  
**24 bis rue Tournefort**  
**F-75005 Paris (FR)**

(74) Mandataire : **Viellefosse, Jean-Claude et al**  
**ROUSSEL UCLAF,**  
**111 Route de Noisy**  
**F-93235 Romainville Cédex (FR)**

(54) **Nouveaux récepteurs Fc-gamma humains solubles, Leur procédé de préparation, les compositions pharmaceutiques les contenant, leur application comme médicaments et leur application diagnostique.**

(57) L'invention a pour objet un récepteur RFc-γIII humain soluble ayant la séquence en acides aminés SEQ ID N°1 :

**EP 0 614 978 A1**

Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp  
 1                      5                      10                      15  
 Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala  
                     20                      25                      30  
 Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu Ser Leu  
                     35                      40                      45  
 Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asn  
                     50                      55                      60  
 Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp  
 65                      70                      75                      80  
 Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro  
                     85                      90                      95  
 Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His Ser  
                     100                      105                      110  
 Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys  
                     115                      120                      125  
 Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro Lys Ala  
                     130                      135                      140  
 Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val Gly Ser  
 145                      150                      155                      160  
 Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly Leu  
                     165                      170                      175  
 Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Ala Asp Pro Arg  
                     180                      185                      190  
 Leu Val

éventuellement précédée d'une méthionine à l'extrémité N-terminale ainsi que les analogues de cette séquence.

La présente invention concerne de nouveaux récepteurs Fc-gamma III humains solubles, leur procédé de préparation, les compositions pharmaceutiques les contenant, leur application comme médicament et leur application diagnostique. Trois classes de récepteur Fc-gamma (RFcγ) qui ont une affinité pour la partie Fc des immunoglobulines G (IgG) humaines ont été décrites. Ils diffèrent par leur affinité pour le ligand, leur distribution cellulaire et leur fonction (J. V. Ravetch et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 9, 457, 1991). Les récepteurs Fc-gamma de classe I (RFcγI), porteurs de l'antigène CD64, sont des récepteurs de forte affinité pour les IgG monomériques. Les récepteurs Fc-gamma de classe II (RFcγII), porteurs de l'antigène CD32 et les récepteurs Fc-gamma de classe III (RFcγIII), porteurs de l'antigène CD 16) sont des récepteurs de faible affinité pour les IgG dans les complexes immuns.

Deux types de récepteurs Fc-gamma III, respectivement RFcγIII-1 et RFcγIII-2 qui possèdent des structures et des expressions cellulaires différentes, ont été décrits (J. V. Ravetch et al., *J. Exp. Med.*, 170, 481, 1989). RFcγIII-1 est un récepteur à une seule chaîne lié à la surface de la membrane cellulaire par un résidu glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) et exprimé exclusivement par les neutrophiles qui représentent le type cellulaire le plus abondant du système immunitaire. RFcγIII-1 fixe les IgG1 et les IgG3 complexées, mais pas les IgG2 et les IgG4 (T. W. J. Huizinga et al., *J. Immunol.*, 142, 2359, 1989). Deux allèles du gène codant pour le RFcγIII-1, appelés respectivement NA1 et NA2, ont été clonés (P. A. Ory et al., *J. Clin. Invest.*, 84, 1688, 1989). RFcγIII-2 est un récepteur membranaire exprimé sur les cellules dites natural killer (NK), les macrophages et les monocytes en culture (J. C. Edberg et al., *J. Immunol.*, 144, 4729, 1990).

Les récepteurs Fc-gamma jouent un rôle important dans la régulation de réactions du système immunitaire (W. H. Fridman et al., *Immunol. Rev.*, 125, 49, 1992). Une des remarquables propriétés des récepteurs Fc-gamma repose sur l'existence de formes solubles qui lient les IgG complexées.

Il a été montré que les récepteurs Fc-gamma peuvent être libérés in vitro dans des surnageants de cultures de cellules T et conserver leur affinité spécifique pour le fragment Fc des IgG. Ces récepteurs solubles ont été appelés IgGBF (Immunoglobulin G Binding Factor) (W. H. Fridman et al., *Cell. Immunol.*, 11, 442, 1974). Ces formes solubles circulent également dans les fluides biologiques humains. Ainsi des formes solubles de RFcγIII, que l'on nomme aussi CD16 soluble (CD16s), sont détectées dans des surnageants de cultures de cellules du sang périphérique (W. H. Fridman et al., *Immunol. Rev.*, 56, 51, 1981) aussi bien que dans du sérum humain (T. W. J. Huizinga et al., *J. Clin. Invest.*, 86, 416, 1990) ou dans la salive (C. Teillaud et al., *Journal de Parodontologie*, Vol 12, N°1, 1, 1992). Ces formes solubles de récepteur RFcγIII sont produites essentiellement par les neutrophiles. Les neutrophiles activés libèrent le CD16 soluble par protéolyse du récepteur lié par un résidu GPI (T. W. J. Huizinga et al., *Nature*, 333, 667, 1988).

On a montré chez des patients présentant une déficience en gène codant pour RFcγIII-1 que le taux de CD16 soluble est faible ou même non détectable (T. W. J. Huizinga et al., *Blood*, 10, 1927, 1990). On a aussi observé que des patients atteints de myélome multiple ont une diminution du taux de CD16 soluble dépendante du stade de la maladie (C. Mathiot et al., *J. Clin. Inv.*, 13, N°1, 41, 1993).

Des clones d'ADNc codant pour les récepteurs RFcγIII humains ont été isolés par G. A. Peltz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 1013, 1989 et D. Simmons et al., *Nature*, 333, 568, 1988. La préparation d'une forme soluble de récepteur RFcγIII constituée du seul domaine extracellulaire qui comprend une chaîne polypeptidique de 188 acides aminés a été décrite dans la demande de brevet européenne EP-A-0343950 ainsi que son utilisation dans le traitement du purpura thrombocytopénique immun.

La présente invention concerne de nouveaux récepteurs RFcγIII humains solubles (noté plus loin récepteur RFcγIII<sub>s</sub>) dont les propriétés biologiques immunosuppressives inattendues permettent leur utilisation comme médicament, notamment dans le domaine des maladies autoimmunes ou des syndromes autoimmuns, des rejets de greffe et des lymphoproliférations malignes.

La présente invention a donc pour objet un récepteur RFcγIII humain soluble ayant la séquence en acides aminés SEQ ID N°1 :

5      Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp  
       1                    5                    10                    15  
       Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala  
                   20                    25                    30  
 10      Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu Ser Leu  
                   35                    40                    45  
       Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asn  
                   50                    55                    60  
 15      Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp  
       65                    70                    75                    80  
       Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro  
                   85                    90                    95  
 20      Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His Ser  
                   100                    105                    110  
       Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys  
                   115                    120                    125  
 25      Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro Lys Ala  
       130                    135                    140  
       Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val Gly Ser  
 30      145                    150                    155                    160  
       Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly Leu  
                   165                    170                    175  
       Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Ala Asp Pro Arg  
 35      180                    185                    190  
       Leu Val

40 éventuellement précédée d'une méthionine à l'extrémité N-terminale ainsi que les analogues de cette séquence.

45 Par analogues, on inclut les séquences modifiées dans la partie C-terminale en position 189 à 194 de la séquence SEQ ID N°1 par substitution, délétion ou addition de un ou plusieurs acides aminés, à l'exception de la séquence dans laquelle les six derniers acides aminés sont éliminés, pour autant que ces produits conservent les propriétés de fixation des IgG1 et des IgG3 caractéristiques du récepteur RFcyllls de l'invention.

50 Ces propriétés de récepteur RFcylll soluble sont mesurées par des méthodes connues telle que la fixation sur des colonnes d'affinité comprenant une IgG humaine d'isotype particulier dont une illustration est donnée plus loin dans la partie expérimentale ou telle que l'inhibition de la formation de rosettes entre des érythrocytes (RBC) recouvertes d'IgG et des cellules exprimant des récepteurs RFcylll selon la méthode décrite par exemple par W. H. Fridman et al., Meth. Enzymol, Vol 116, 403, 1986. Le récepteur RFcyllls de l'invention peut être préparé par la technologie classique des protéines selon les méthodes connues de la synthèse peptidique ou les méthodes connues du génie génétique qui comprend l'insertion d'une séquence d'ADN codant pour le récepteur RFcyllls de l'invention dans un vecteur d'expression, la transformation de cellules avec ce vecteur et l'isolement du produit exprimé.

55 Un des aspect de l'invention concerne un récepteur RFcylll humain soluble tel qu'obtenu par l'expression dans une cellule hôte d'un ADN codant la séquence en acides aminés SEQ ID N°1 :

Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp  
 1                      5                      10                      15  
 5 Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala  
                     20                      25                      30  
 Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu Ser Leu  
                     35                      40                      45  
 10 Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asn  
                     50                      55                      60  
 Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp  
 15 65                      70                      75                      80  
  
 Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro  
                     85                      90                      95  
 20 Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His Ser  
                     100                      105                      110  
 Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys  
 25                      115                      120                      125  
 Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro Lys Ala  
                     130                      135                      140  
 Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val Gly Ser  
 30 145                      150                      155                      160  
 Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly Leu  
                     165                      170                      175  
 35 Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Ala Asp Pro Arg  
                     180                      185                      190  
 Leu Val

40 éventuellement précédée d'une méthionine à l'extrémité N-terminale ainsi que les analogues de cette séquence.

Lorsque le récepteur RFcyllls est obtenu par expression dans une cellule hôte, celle-ci est réalisée selon les méthodes connues de génie génétique et de culture cellulaire.

45 L'expression peut être réalisée dans une cellule hôte procaryote, par exemple E. coli ou dans une cellule eucaryote contenant la séquence codant pour le récepteur RFcyllls de l'invention précédée d'une séquence promoteur convenable.

L'invention concerne plus précisément un récepteur RFcylll humain soluble tel qu'obtenu par l'expression dans une cellule hôte eucaryote d'un ADN codant la séquence en acides aminés SEQ ID N°1 :

50

55

Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala  
 20 25 30  
 Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu Ser Leu  
 10 35 40 45  
 Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asn  
 50 55 60  
 15  
 Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp  
 65 70 75 80  
 20 Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro  
 85 90 95  
 Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His Ser  
 100 105 110  
 25 Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys  
 115 120 125  
 Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro Lys Ala  
 30 130 135 140  
 Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val Gly Ser  
 145 150 155 160  
 35 Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly Leu  
 165 170 175  
 Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Ala Asp Pro Arg  
 180 185 190  
 40 Leu Val

Les cellules hôte eucaryotes comprennent les levures ainsi que les cellules d'organismes supérieurs, par  
 exemple des cellules de mammifères. Les cellules de mammifères sont par exemple des fibroblastes tels que  
 45 les cellules L de souris, des cellules de hamster telles que les cellules CHO ou les cellules BHK ou des cellules  
 COS de singe.

L'invention concerne aussi une séquence d'ADN comprenant une séquence d'ADN codant pour le récep-  
 teur RFcyIII humain soluble ayant la séquence en acides aminés SEQ ID N°1 ou une séquence analogue de  
 celle-ci. L'invention concerne notamment une séquence d'ADN codant pour le récepteur RFcyIII humain soluble  
 50 ayant la séquence en acides aminés SEQ ID N°1 ou une séquence analogue de celle-ci.

L'invention concerne spécialement une séquence d'ADN codant pour le récepteur RFcyIII de l'invention  
 constituée essentiellement de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2. La séquence SEQ ID N°2 est obtenue  
 à partir d'une séquence d'ADNc dont le clonage a été décrit (D. Simmons et al., déjà cité) et dans laquelle une  
 séquence contenant un codon de terminaison de la traduction est introduite par les méthodes de mutagenèse  
 55 dirigée. La séquence SEQ ID N°2 qui comprend 672 nucléotides contient une région codante pour le récepteur  
 RFcyIII. La séquence déduite en acides aminés est donnée en dessous (SEQ ID N°3). La séquence en acides  
 aminés du récepteur RFcyIII, commençant à la position +1, comprend 194 acides aminés et est précédée  
 d'une séquence signal peptide ayant 18 acides aminés.

L'invention a également pour objet des vecteurs d'expression comprenant une séquence d'ADN codant pour un récepteur RFcylII humain soluble selon l'invention ainsi que des hôtes transformés avec un vecteur ci-dessus.

L'invention concerne particulièrement un hôte qui est une cellule eucaryote.

5 Un autre aspect de l'invention concerne un procédé qui comprend l'expression du récepteur RFcylII humain soluble dans une cellule hôte transformée ci-dessus et notamment un procédé dans lequel la cellule hôte est une cellule eucaryote et dont un exemple est décrit plus loin.

La présente invention a également pour objet des anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur RFcylII humain soluble selon l'invention ou contre un fragment immunogène de celui-ci. Les anticorps sont  
10 préparés selon les méthodes connues et peuvent être utilisés par exemple pour diagnostiquer des pathologies caractérisées par une modification des taux de récepteurs FcylII solubles ou pour le dosage du récepteur RFcylII de l'invention dans des fluides biologiques en utilisant le récepteur RFcylII ci-dessus comme molécule standard, par exemple dans un test ELISA. L'invention a ainsi également pour objet une composition de diagnostic comprenant un ou plusieurs anticorps selon l'invention.

15 Le récepteur RFcylII de l'invention a de remarquables propriétés biologiques immunosuppressives, en particulier une activité antiproliférative, une activité inhibitrice de la production des immunoglobulines ainsi qu'une activité anticytotoxicité cellulaire de type Natural Killer (NK) comme le montrent les résultats donnés plus loin.

Ces propriétés rendent le récepteur RFcylII de l'invention utilisable dans le traitement de maladies autoim-  
20 munes telles que par exemple le diabète auto-immun, la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux dissimulé ou la sclérose en plaques ainsi que dans le traitement de syndromes autoimmuns consécutifs à des traitements immunostimulants, par exemple à un traitement par de l'interleukine 2. Le produit de l'invention peut être également utile dans le traitement de lymphoproliférations malignes en particulier les lymphomes et les myélomes B ou dans la prévention de rejets de greffe consécutives à des transplantations d'organes  
25 et dans le traitement de lymphoproliférations malignes.

La présente invention a donc pour objet à titre de médicament, le récepteur RFcylII humain soluble de l'invention.

L'invention s'étend aux compositions pharmaceutiques renfermant comme principe actif un médicament défini ci-dessus et concerne particulièrement les compositions pharmaceutiques pour moduler la prolifération  
30 cellulaire, pour moduler la cytotoxicité de type NK ou pour moduler la production d'anticorps.

Le principe actif peut être incorporé à des excipients usuels pour la préparation des compositions pharmaceutiques ci-dessus. Les compositions de l'invention peuvent être administrées par voie parentérale, orale ou locale.

Les figures ci-annexées illustrent certains aspects de l'invention :

35 La figure 1 représente le schéma du plasmide pKC3-RFcylII contenant l'insert de la séquence SEQ ID N°2.

La figure 2 représente la détection de l'ARN spécifique du RFcylII dans les clones résistants sélectionnés C4 à C8 avec des cellules LAK comme témoin positif et des cellules L comme témoin négatif, par la méthode Dot blot ou la méthode Northern blot à l'aide d'une sonde radioactive spécifique.

40 La figure 3 représente le titrage du RFcylII dans l'effluent (EF) et dans l'éluat acide (EL) de la colonne d'affinité 3G8 par rapport au bouillon récolté (D), par immunoempreinte à l'aide d'un anticorps monoclonal BW209/2 radiomarqué.

La figure 4 représente le titrage de la spécificité du RFcylII purifié à fixer les IgG (IgG1 à IgG4) ainsi que des fragments F(ab')<sub>2</sub> d'IgG, par immunoempreinte à l'aide de l'anticorps BW209/2 radiomarqué dans l'effluent  
45 (a) et dans l'éluat (b) respectifs d'une colonne d'IgG donnée ou de fragment F(ab')<sub>2</sub>.

La figure 5 représente la SDS-PAGE du RFcylII purifié. Le RFcylII radiomarqué est détecté par autoradiographie avant ou après déglycosylation par Endo F (figure 5A) ou par Western blot (figure 5B, ligne 1) à l'aide de l'anticorps BW209/2 radiomarqué comparativement à un contrôle-témoin (figure 5B, ligne 2).

50 La figure 6 représente l'effet inhibiteur du RFcylII sur la cytotoxicité NK des cellules effecteurs LAK (figure 6A) ou des cellules effecteurs PBL (figure 6B) exprimée en % de lyse de cellules cibles K562 mesurée par le relargage de Cr51 en fonction de la concentration relative des cellules effecteurs LAK ou PBL/cibles et de la concentration en RFcylII.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans la limiter.

55 **EXEMPLE 1 : production d'un récepteur FcylII humain soluble (RFcylII) dans des cellules d'eucaryotes.**

Des cellules d'eucaryotes qui sécrètent en permanence un récepteur RFcylII sont obtenues par co-trans-

fection avec un vecteur portant un marqueur de sélection et un vecteur d'expression portant une séquence d'ADN codant pour le récepteur RFcyllls et un promoteur compatible avec la souche hôte. Les activités biologiques sont déterminées sur le produit isolé et purifié à l'homogénéité.

## 5 A - Construction de la séquence codante :

La séquence d'ADN codant pour le récepteur RFcyllls est obtenue à partir de l'ADNc codant pour un récepteur RFcyll exprimé dans les PMN dans lequel on introduit une séquence nucléotidique notée "stop linker" contenant un codon TAG de terminaison de la traduction :

10 Le plasmide pCD16 décrit par D. Simmons (déjà cité) comprend un insert d'ADNc de 893 bp dans lequel on introduit le "stop linker" GCGGATCCTAGACTAGTCTAG (SEQ ID N°4) à la position 652, selon les méthodes connues de mutagenèse dirigée. pCD16 est successivement digéré par l'endonuclease de restriction KpnI, traité avec de la T4-DNA polymérase pour enlever l'extrémité 3' protubérante, puis ligaturé à un oligonucléotide ayant la séquence CGCGGATCCGCG (SEQ ID N°5) contenant un site BamHI. Le fragment obtenu est  
15 ensuite cloné dans un plasmide portant un site BamHI unique. Pour créer le codon stop TAG après le site BamHI, un site SpeI est d'abord éliminé. Le site BamHI est clivé puis les extrémités créées sont remplies à l'aide du fragment Klenow de la DNA polymérase de E. coli. Une séquence "linker SpeI" CTAGACTAGTCTAG (SEQ ID N°6), contenant un site de restriction de l'enzyme SpeI, est insérée. On obtient l'insert de 672 bp ayant la séquence nucléotidique SEQ ID N°2.

20 L'insert a été sous cloné aux sites BstXI du plasmide CDM8 (B. Seed, Nature, 329, 840, 1987). Après digestion avec l'enzyme de restriction XbaI, le fragment isolé est inséré dans le site polylinker du plasmide pKC3 dérivé du plasmide pKO-néo (K. Van Doren et al., J. Virol., 50, 606, 1984) et dont la structure est montrée à la figure 1.

Le plasmide obtenu est dénommé pKC3-RFcyllls (figure 1).

25

## B - Transfection et sélection d'une cellule transformée.

Le plasmide pKC3-RFcyllls est introduit par cotransfection avec le plasmide pSV2-néo (K. Van Doren et al., déjà cité) dans des fibroblastes murins (cellules L) par la méthode de coprécipitation au phosphate de calcium :

30

Des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre sont ensemencées avec 106 cellules L cultivées en milieu DMEM (Gibco BRL) complété avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (Flow laboratories), 100 UI/ml de pénicilline (Gibco BRL), 100 µg/ml de streptomycine (Gibco BRL), 2mM de L-glutamine (Gibco BRL). Après une nuit d'incubation à 37°C en étuve à 7 % de CO<sub>2</sub>, les cellules sont cotransfectées avec 10 µg de plasmide pKC3-RFcyllls  
35 et 100 ng de plasmide pSV2-neo. Après trois jours de culture, les cellules sont placées en milieu sélectif contenant 1 mg/ml d'antibiotique G-418 (Geneticin, G-418 sulfate, Gibco BRL) puis sont maintenues dans un milieu contenant 500 µg/ml de G-418.

L'ARN total de clones résistants au milieu de sélection est isolé et analysé selon les techniques de Dot blot et de Northern blot. L'ARN spécifique du récepteur RFcyllls est détecté à l'aide d'une sonde spécifique  
40 constituée du fragment XbaI-XbaI de pKC3-RFcyllls marquée au <sup>32</sup>P avec [α-<sup>32</sup>P] dCTP (370 MBq/ml) par la méthode "random primer" décrite par A. P. Feinberg et al. Anal. Biochem 132, 6, 1983.

On utilise comme contrôle positif l'ARN de lymphocytes humains cultivés en présence d'interleukine 2 (cellules LAK) et comme contrôle négatif des cellules L non transfectées.

La figure 2 montre les résultats obtenus avec cinq clones résistants désignés C4 à C8. Le clone C8, noté  
45 plus loin IIIC8, qui renferme le plus grand nombre de copies d'ARN codant pour le récepteur RFcyllls est sélectionné pour les travaux ultérieurs.

## C - Production du récepteur RFcyllls.

50

Le clone IIIC8 est cultivé dans un bioréacteur de type Acusyst Junior (Endotronics) dans le milieu DMEM complété à 5 % de SVF. Le bioréacteur de 1,1 m<sup>2</sup> est ensemencé avec 3X10<sup>8</sup> cellules et un flux continu de milieu DMEM à 5 % de SVF est installé au débit de 1 ml/h. La récolte du bouillon est effectuée du jour 12 au jour 22.

55

## EXEMPLE 2 : purification du récepteur RFcyllls.

60 ml du bouillon récolté ci-dessus sont dialysés pendant 18 h à 4°C contre du tampon Tris-Base 20 mM à pH 7,6, puis passés sur une colonne de 0,5 ml de BSA-Sépharose 4B (Pharmacia) et chromatographiés au



débit de 15 à 20 ml/h, à 4°C sur une colonne contenant 0,5 ml de Sepharose 4B (Pharmacia) couplé à l'anticorps monoclonal 3G8 qui est un anticorps de souris anti-CD16 d'isotype IgG1, k décrit par H. B. Fleit et al. (Proc. Natl. Acad. Sci 79, 3275, 1982) et équilibré dans le tampon Tris-Base 20 mM à pH 7,6. L'effluent est passé à nouveau deux fois sur la même colonne. La colonne est lavée avec 40 ml du même tampon puis éluée au débit de 3 ml/h avec un tampon glycine-HCl 0,2 M à pH 2,8. On obtient 2 ml d'éluat acide que l'on neutralise avec un tampon Tris-Base 2M à pH 9 que l'on soumet aux analyses suivantes :

a) Teneur en protéine

L'éluat acide obtenu renferme  $72 \pm 45$  µg de protéine titrée selon le micro essai de Bradford (Bio-Rad Protein Assay).

b) Teneur en récepteur RFcylIs

La mise en évidence du récepteur RFcylIs est faite par empreinte directe sur une membrane de nitrocellulose en utilisant l'anticorps monoclonal BW209/2 qui est un anticorps monoclonal de souris anti-CD16, d'isotype IgG2a décrit par D. Simmons et al. (déjà cité) et que l'on a radiomarqué à l'iode 125.

Les résultats de l'immunoempreinte effectuée simultanément sur le bouillon de départ (D), sur l'effluent (EF) et sur l'éluat acide (EL) de la colonne d'affinité permettent d'évaluer le rendement de la chromatographie d'affinité entre 16 et 30 % de la teneur initiale en récepteur RFcylIs présent dans le bouillon récolté (figure 3).

**EXEMPLE 3 : caractérisation du récepteur RFcylIs**

**A - Spécificité isotypique de la fixation des IgG**

La spécificité de fixation des IgG du récepteur RFcylIs de l'invention est déterminée par chromatographie d'affinité sur une colonne d'IgG humaine d'isotype déterminé.

Le bouillon récolté, dialysé et passé sur la colonne de BSA-Sépharose 4B obtenu à l'exemple 2 est chromatographié sur une colonne contenant 0,5 ml de Sépharose 4B auquel est couplé 3 mg d'IgG humaine monoclonale d'isotype respectif IgG1, IgG2-kappa, IgG3-kappa, IgG4-kappa ou de fragments  $F(ab')_2$  d'IgG polyclonale préparés par digestion d'une IgG humaine par la pepsine suivie d'une purification sur une colonne de protéine A-sépharose CL-4B (Pharmacia). Chaque colonne d'immunoabsorbant est lavée avec un tampon Tris-Base 20 mM à pH 7,6 puis éluée avec un tampon glycine-HCl 0,2M à pH 2,8. Chaque éluat acide obtenu respectivement est neutralisé avec un tampon Tris-Base 2M à pH 9.

50 µl du matériel de départ, de chaque effluent et de chaque éluat acide correspondant après neutralisation sont respectivement testés en empreinte directe avec l'anticorps monoclonal anti-CD16 BW209/2 radiomarqué, comme indiqué à l'exemple 2.

Les résultats donnés à la figure 4 montrent des spots intenses dans les éluats (b) correspondant aux immuno-adsorbants d'IgG1 et d'IgG3 immobilisées tandis que les éluats (b) des immunoabsorbants d'IgG2, IgG4 ou de  $F(ab')_2$  sont négatifs et que les effluents (a) donnent des spots faibles inférieurs à celui du matériel de départ (S. MAT). Ces résultats indiquent que le récepteur RFcylIs de l'invention se fixe aux IgG1 et IgG3 insolubilisées et ne se fixe pas de façon significative aux IgG2 et IgG4.

**B - Homogénéité**

Le récepteur RFcylIs purifié ci-dessus est analysé par électrophorèse SDS-PAGE sur des gels à 10 % de polyacrylamide selon la méthode de Laemmli (Nature, 227, 680, 1970) dans un système de gel minilab (Mini-Protein II Electrophoresis cell, Bio-Rad) suivie d'une révélation par autoradiographie ou par immuno-détection :

a) SDS-PAGE et autoradiographie :

On utilise des échantillons d'éluat acide positif à l'immunoempreinte obtenu à l'exemple 2 que l'on dialyse contre du tampon PBS puis radiomarque à l'iode 125 à l'aide d'iodure de sodium radioactif par la méthode à la chloramine T. L'éluat radiomarqué est éventuellement ensuite déglycosylé : 0,1 ml d'éluat radiomarqué est dilué avec 9 volumes de tampon phosphate de sodium 100 mM à pH 6,1 contenant 50 mM d'EDTA, 1 % de Triton X-100 et 1 % de 2-mercaptoéthanol, maintenu à 100°C pendant 5 minutes, puis traité par une unité de

ENDO F (Endo- $\beta$ -N-acétyl glucosaminidase F, Boehringer Mannheim Biochemica) à 37°C pendant 18 heures puis par l'acide trichloracétique à 10 %. Le précipité obtenu est lavé avec de l'acétone à -20°C, porté à 100°C dans du tampon Tris-HCl 80 mM à pH 6,8 contenant 100 mM de DTT, 2 % de SDS, 10 % de glycérol et 0,01 % de bleu de bromophénol.

- 5 L'échantillon radiomarqué avant déglycosylation (- EndoF) révèle par autoradiographie une seule bande correspondant à un poids moléculaire apparent de 48kDa alors que l'échantillon radiomarqué puis déglycosylé (+ Endo F) révèle deux bandes à 26 et 30 kDa (figure 5A).

b) SDS-PAGE et Western Blotting :

10

30  $\mu$ l d'éluat acide obtenu à l'exemple 2 sont portés à ébullition pendant trois minutes dans le tampon SDS d'échantillon puis soumis à la SDS-PAGE pendant 40 minutes à 200 volts à la température ambiante. Le gel est lavé avec un tampon Tris-base 25 mM à pH 8,3 contenant de la glycine 192 mM et 2 % de méthanol, puis transféré sur une membrane de nitrocellulose (BA-85, 0, 45  $\mu$ m, Schleicher & Schüll) pendant une heure à 15 100 volts en utilisant un système de transfert (Bio-Rad, Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer cell). La membrane de nitrocellulose est ensuite saturée pendant 45 minutes à 40°C dans un tampon Tris-HCl 10 mM à pH 7,4 contenant NaCl 150 mM et 5 % de BSA (Western buffer, noté WB) et incubée pendant 18 heures à 4°C avec l'anticorps monoclonal anti-CD16 BW209/2 marqué à l'iode 125, à la concentration de 10<sup>6</sup> cpm par ml pour 10 cm<sup>2</sup> de nitrocellulose. La membrane est ensuite lavée successivement deux fois dans le tampon WB, 20 une fois dans le tampon WB contenant 0,05 % de Nonidet P40 (Fluka) et encore deux fois dans le tampon WB, puis est exposée pendant une nuit à -70°C à un film Kodak X-OMAT S (Eastman Kodak) pour autoradiographie.

On traite de la même façon un éluat acide obtenu à partir de cultures de cellules L non transfectées, à titre de contrôle témoin.

- 25 Les résultats donnés à la figure 5B montrent que le RFcyl1ls purifié (ligne 1) migre comme une glycoprotéine ayant un PM apparent de 48 kDa tandis qu'aucune détection n'est observée avec le contrôle témoin (ligne 2).

**EXEMPLE 4 : activité immunosuppressive du récepteur RFcyl1ls**

- 30 Le récepteur RFcyl1ls purifié ci-dessus présente une activité immunosuppressive qui est évaluée sur des cellules activées in vitro par mesure de sa capacité à inhiber respectivement :

- la prolifération de lymphocytes stimulés;
- la production d'anticorps par les lymphocytes;
- la cytotoxicité des cellules NK (natural killer).

35

**A - Inhibition de la prolifération des PBMC stimulés par le mitogène pokeweed (PWM)**

- 40 Les cellules mononucléaires du sang périphériques (PBMC) de donneur sains sont préparés par séparation à l'aide d'un gradient de densité de Ficoll-Isopaque. Les PBMC décongelés sont cultivés dans des plaques de 96 puits (Falcon 3072) à 37°C dans une atmosphère humide à 7 % de CO<sub>2</sub>. Les PBMC sont ajustés à 2 X 10<sup>6</sup> cellules /ml dans du milieu RPMI-1640 (Gibco) complété avec 10 % de sérum de veau foetal (SVF) (Flow Laboratories), 100 UI/ml de pénicilline, 100  $\mu$ g mM/ml de streptomycine, 1 % de L-glutamine, 1 % d'acides aminés non essentiels (Gibco) et de 0,05 M/l de 2-mercaptoéthanol (Gibco).

- 45 2 X 10<sup>6</sup> cellules sont réparties dans les plaques de 96 puits et incubées pendant 6 jours dans un volume final de 200  $\mu$ l de milieu de culture contenant du PWM (IBF) à la concentration de 0,1  $\mu$ g/ml (contrôle stimulé) ou ne contenant pas de PWM (contrôle non stimulé) et en présence de différentes doses de RFcyl1ls purifié à l'exemple 2 ou de tampon PBS (contrôle). Chaque culture est faite en trois répliques. La prolifération des PBMC est mesurée au sixième jour de culture par incorporation de 1  $\mu$ Ci de thymidine tritiée (Amersham). Après 6 heures d'incubation à 37°C en présence de 7 % de CO<sub>2</sub>, la quantité de radioactivité incorporée est mesurée avec un compteur bêta (Pharmacia).

- 50 Le pourcentage d'inhibition de la prolifération est calculé par rapport au contrôle stimulé. Les résultats obtenus dans deux expériences séparées sont donnés dans le tableau suivant :

55

Tableau 1

PWM dose de RFcylls µg / ml		Thymidine incorporée cpm	% inhibition
1° expérience			
-	-	153	
+	-	38393	
+	0,012	37600	0
+	1,5	22558	41
+	6,2	4376	89
2° expérience			
-	-	542	
+	-	40798	
+	0,012	43410	0
+	1,5	32207	21
+	6,2	62	100

A la dose de 6,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en RFcylls, l'activation de la prolifération des PBMC stimulés par PWM est totalement inhibée.

#### B - Inhibition de la production d'anticorps par les PBMC stimulés par le PWM

Les cultures cellulaires sont réalisées comme précédemment en trois répliques.

La production d'IgG et d'IgM est mesurée au sixième jour dans les surnageants à l'aide d'un test ELISA spécifique des IgG ou des IgM, selon la méthode décrite par E. Thibaut et al. J. Immunol. Meth., 104, 15, 1987.

Le pourcentage d'inhibition de la production d'anticorps est calculé par rapport au contrôle stimulé.

Les résultats obtenus dans deux expériences sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau 2

PWM dose de RFcylls µg / ml		IgM ng/ml	% inhibition	IgG ng/ml	% inhibition
1° experience					
5	-	-	100	/	18
	+	-	582	/	192
	+	0,012	492	15	100
	+	1,5	64	89	10
	+	6,2	0	100	12
2° expérience					
15	-	-	170	/	20
	+	-	287	/	156
	+	0,012	190	34	78
	+	1,5	0	100	0
	+	6,2	0	100	0
20	-	-	170	/	20
	+	-	287	/	156
	+	0,012	190	34	78
	+	1,5	0	100	0
	+	6,2	0	100	0

25 A la dose de 1,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en RFcylls, la production d'IgG ou d'IgM par les PBMC stimulés par PWM est totalement inhibée.

### C - Inhibition de la cytotoxicité de type NK

30 L'étude est réalisée sur des cellules mononuclées circulantes humaines incubées ou non en présence d'IL2 et dont on détermine l'effet cytotoxique vis à vis de cellules cibles tumorales K562 qui est une lignée érythro-leucémique sensible aux cellules NK, par mesure du relargage de Cr51 en 4 heures.

35 Les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBL) de donneurs sains sont préparés à l'aide d'un gradient de Ficoll-Isopaque, lavés et ajustés à  $10 \times 10^6$  cellules /ml dans du milieu RPMI 1640 (Gibco) complété avec 10 % de SVF, 1 % de L-glutamine, 100 UI/ml de pénicilline et 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de streptomycine (noté RPMI 10 % SVF).

Les cellules LAK sont obtenues par culture des PBL pendant trois jours à 37°C en atmosphère humide à 7 % de CO2 en présence de 1000 u/ml d'IL2.

40 Les cellules effecteurs PBL ou LAK sont incubées à la concentration de  $10 \times 10^6$  cellules/ml dans du milieu RPMI 10 % SVF pendant 2 heures à 37°C en présence de différentes doses de récepteur RFcylls purifié à l'exemple 2. Les cellules sont ensuite lavées et remises en suspension à  $5 \times 10^6$  cellules/ml dans le même milieu.

45 100  $\mu\text{l}$  de cellules effecteurs PBL ou LAK contenant  $5 \times 10^6$  à  $7 \times 10^4$  cellules sont incubés avec 100  $\mu\text{l}$  de cellules cibles ( $5 \times 10^4$  cellules) dans des plaques en V à 96 puits pendant 4 heures à 37°C. Après centrifugation à 2000 rpm pendant 5mn, 100  $\mu\text{l}$  de surnageant sont prélevés dans lequel on mesure la radioactivité présente.

50 Les résultats sont exprimés en pourcentage de lyse des cellules cibles. Les figures 6A et 6B montrent l'inhibition de la lyse respectivement par les cellules LAK et par les PBL en présence de doses variables de récepteur RFcylls purifié en fonction de la concentration relative effecteurs/cibles.

LISTE DE SEQUENCES

5

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

10

- (A) NOM: ROUSSEL UCLAF
- (B) RUE: 35, Boulevard des Invalides
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75007
- (H) TELECOPIE: (33) 1.49.91.46.10

15

- (A) NOM: The General Hospital Corporation
- (B) RUE: Fruit Street
- (C) VILLE: BOSTON
- (D) PROVINCE: MASSACHUSETTS
- (E) PAYS: UNITED STATES OF AMERICA
- (F) CODE POSTAL: 02114

20

25

- (ii) TITRE DE L' INVENTION: Nouveaux recepteurs Fc-gamma III humains solubles, leur procede de preparation, les compositions pharmaceutiques les contenant, leur application comme medicaments et leur application diagnostique.

30

- (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 6

35

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)  
et WORDPERFECT 5.1 pour corrections informations 2 (ii)

40

45

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 194 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

50

- (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

55

## (vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Homo sapiens

5

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp  
 10 1 5 10 15  
 Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala  
 20 25 30  
 Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu Ser Leu  
 15 35 40 45  
 Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asn  
 20 50 55 60  
 Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp  
 25 65 70 75 80  
 Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro  
 85 90 95  
 Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His Ser  
 100 105 110  
 Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys  
 35 115 120 125  
 Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro Lys Ala  
 40 130 135 140  
 Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val Gly Ser  
 145 150 155 160  
 Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly Leu  
 45 165 170 175  
 Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Ala Asp Pro Arg  
 50 180 185 190  
 Leu Val

55

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 672 paires de bases  
 (B) TYPE: acide nucléique  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 10 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (vi) ORIGINE:  
 15 (A) ORGANISME: Homo sapiens
- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:  
 (A) NOM/CLE: CDS  
 20 (B) EMBLEMENT: 34..669
- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:  
 (A) NOM/CLE: mat\_peptide  
 25 (B) EMBLEMENT: 88..669
- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:  
 (A) NOM/CLE: sig\_peptide  
 30 (B) EMBLEMENT: 34..87
- (x) INFORMATION DE LA PUBLICATION:  
 (A) AUTEURS: Simmons, David  
 35 Seed, Brian  
 (B) TITRE: The Fc gamma receptor of natural killer cells  
 is a phospholipid-linked membrane protein  
 (C) REVUE: Nature  
 40 (D) VOLUME: 333  
 (F) PAGES: 568-570  
 (G) DATE: JUNE-9-1988  
 (K) RESIDUES PERTINENTS DANS LA SEQ ID NO: 2: DE 1 JUSQU'AU 650  
 45
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

50 TCTTTGGTGA CTTGTCCACT CCAGTGTGGC ATC ATG TGG CAG CTG CTC CTC CCA 54  
 Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro  
 -18 -15

55

5	ACT GCT CTG CTA CTT CTA GTT TCA GCT GGC ATG CCG ACT GAA GAT CTC Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu -10 -5 1 5	102
10	CCA AAG GCT GTG GTG TTC CTG GAG CCT CAA TGG TAC AGC GTG CTT GAG Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Ser Val Leu Glu 10 15 20	150
15	AAG GAC AGT GTG ACT CTG AAG TGC CAG GGA GCC TAC TCC CCT GAG GAC Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp 25 30 35	198
20	AAT TCC ACA CAG TGG TTT CAC AAT GAG AGC CTC ATC TCA AGC CAG GCC Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala 40 45 50	246
25	TCG AGC TAC TTC ATT GAC GCT GCC ACA GTC AAC GAC AGT GGA GAG TAC Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asn Asp Ser Gly Glu Tyr 55 60 65	294
30	AGG TGC CAG ACA AAC CTC TCC ACC CTC AGT GAC CCG GTG CAG CTA GAA Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu 70 75 80 85	342
35	GTC CAT ATC GGC TGG CTG TTG CTC CAG GCC CCT CCG TGG GTG TTC AAG Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys 90 95 100	390
40	GAG GAA GAC CCT ATT CAC CTG AGG TGT CAC AGC TCG AAG AAC ACT GCT Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala 105 110 115	438
45	CTG CAT AAG GTC ACA TAT TTA CAG AAT GGC AAA GAC AGG AAG TAT TTT Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Asp Arg Lys Tyr Phe 120 125 130	486
50	CAT CAT AAT TCT GAC TTC CAC ATT CCA AAA GCC ACA CTC AAA GAT AGC His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser 135 140 145	534
55	GGC TCC TAC TTC TGC AGG GGG CTT GTT GGG AGT AAA AAT GTG TCT TCA Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser 150 155 160 165	582



GAG ACT GTG AAC ATC ACC ATC ACT CAA GGT TTG GCA GTG TCA ACC ATC 630  
 Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile  
 5 170 175 180

TCA TCA TTC TCT CCA CCT GGC GCG GAT CCT AGA CTA GTC TAG 672  
 Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Ala Asp Pro Arg Leu Val  
 10 185 190

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

15 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 212 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

20

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

25

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Val Ser Ala  
 -18 -15 -10 -5

30

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro  
 1 5 10

35

Gln Trp Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln  
 15 20 25 30

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu  
 35 40 45

40

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr  
 50 55 60

45

Val Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu  
 65 70 75

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln  
 80 85 90

50

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys  
 95 100 105 110

55

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn  
115 120 125

5 Gly Lys Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro  
130 135 140

10 Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val  
145 150 155

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln  
160 165 170

15 Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Ala Asp  
175 180 185 190

20 Pro Arg Leu Val

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

25

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 21 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

30

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: OLIGONUCLEOTIDE

35

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: misc\_feature

(B) EMPLACEMENT: 1..21

40

(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /note= "Stop linker"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

45

GCGGATCCTA GACTAGTCTA G

21

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

50

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 12 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

55

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: OLIGONUCLEOTIDE

5

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:

(A) NOM/CLE: misc\_feature

(B) EMBLACEMENT: 1..12

10

(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /note= "Oligonucleotide contenant  
un site BamHI"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

15

CGCGGATCCG CG

12

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

20

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 14 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

25

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: OLIGONUCLEOTIDE

30

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:

(A) NOM/CLE: misc\_feature

(B) EMBLACEMENT: 1..14

35

(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /note= "Linker SpeI"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

40

CTAGACTAGT CTAG

14

45

# Revendications

1) Récepteur RFcylII humain soluble ayant la séquence en acides aminés SEQ ID N°1:

50

55

5 Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala  
 20 25 30  
 Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu Ser Leu  
 10 35 40 45  
 Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asn  
 50 55 60  
 15 Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp  
 65 70 75 80  
 Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro  
 85 90 95  
 20 Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His Ser  
 100 105 110  
 Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys  
 115 120 125  
 25 Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro Lys Ala  
 130 135 140  
 Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val Gly Ser  
 30 145 150 155 160  
 Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly Leu  
 165 170 175  
 35 Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Ala Asp Pro Arg  
 180 185 190  
 Leu Val

40

éventuellement précédée d'une méthionine à l'extrémité N-terminale ainsi que les analogues de cette séquence.

2) Récepteur RFcylII humain soluble tel qu'obtenu par l'expression dans une cellule hôte d'un ADN codant la séquence en acides aminés SEQ ID N°1 :

45

50 Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp  
 1 5 10 15

55

Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala  
 20 25 30  
 5 Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu Ser Leu  
 35 40 45  
 Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asn  
 50 55 60  
 10 Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp  
 65 70 75 80  
 Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro  
 85 90 95  
 15 Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His Ser  
 100 105 110  
 Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys  
 115 120 125  
 Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro Lys Ala  
 130 135 140  
 25 Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val Gly Ser  
 145 150 155 160  
 Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly Leu  
 165 170 175  
 30 Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Ala Asp Pro Arg  
 180 185 190  
 Leu Val

35

éventuellement précédée d'une méthionine à l'extrémité N-terminale ainsi que les analogues de cette séquence.

3) Récepteur RFcylII humain soluble tel qu'obtenu par l'expression dans une cellule hôte eucaryote d'un ADN codant la séquence en acides aminés SEQ ID N° 1 :

Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp  
 45 1 5 10 15  
 Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala  
 20 25 30  
 Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu Ser Leu  
 50 35 40 45  
 Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asn  
 50 55 60

55

[illegible]

- 4) Séquence d'ADN comprenant une séquence d'ADN codant pour le récepteur RFcyIII humain soluble selon la revendication 1.
- 5) Séquence d'ADN codant pour le récepteur RFcyIII humain soluble selon la revendication 1.
- 6) Séquence d'ADN selon la revendication 5 constituée essentiellement de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2.
- 7) Vecteurs d'expression comprenant une séquence d'ADN codant pour un récepteur RFcyIII humain soluble selon la revendication 1.
- 8) Hôtes transformés avec un vecteur selon la revendication 7.
- 9) Hôte selon la revendication 8 qui est une cellule eucaryote.
- 10) Procédé qui comprend l'expression du récepteur RFcyIII humain soluble dans une cellule hôte transformée par un ADN codant pour un récepteur RFcyIII humain soluble selon la revendication 1.
- 11) Procédé selon la revendication 10 dans lequel la cellule hôte est une cellule eucaryote.
- 12) Anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur RFcyIII humain soluble selon la revendication 1 ou contre un fragment immunogène de celui-ci.
- 13) Composition de diagnostic comprenant un ou plusieurs anticorps selon la revendication 12.
- 14) A titre de médicament, le récepteur RFcyIII humain soluble selon la revendication 1.
- 15) Compositions pharmaceutiques renfermant comme principe actif un médicament selon la revendication 14.
- 16) Compositions pharmaceutiques selon la revendication 15 pour moduler la prolifération cellulaire.
- 17) Compositions pharmaceutiques selon la revendication 15 pour moduler la cytotoxicité de type NK.
- 18) Compositions pharmaceutiques selon la revendication 15 pour moduler la production d'anticorps.

PLASMIDE pKC3-RFc-III<sub>s</sub>

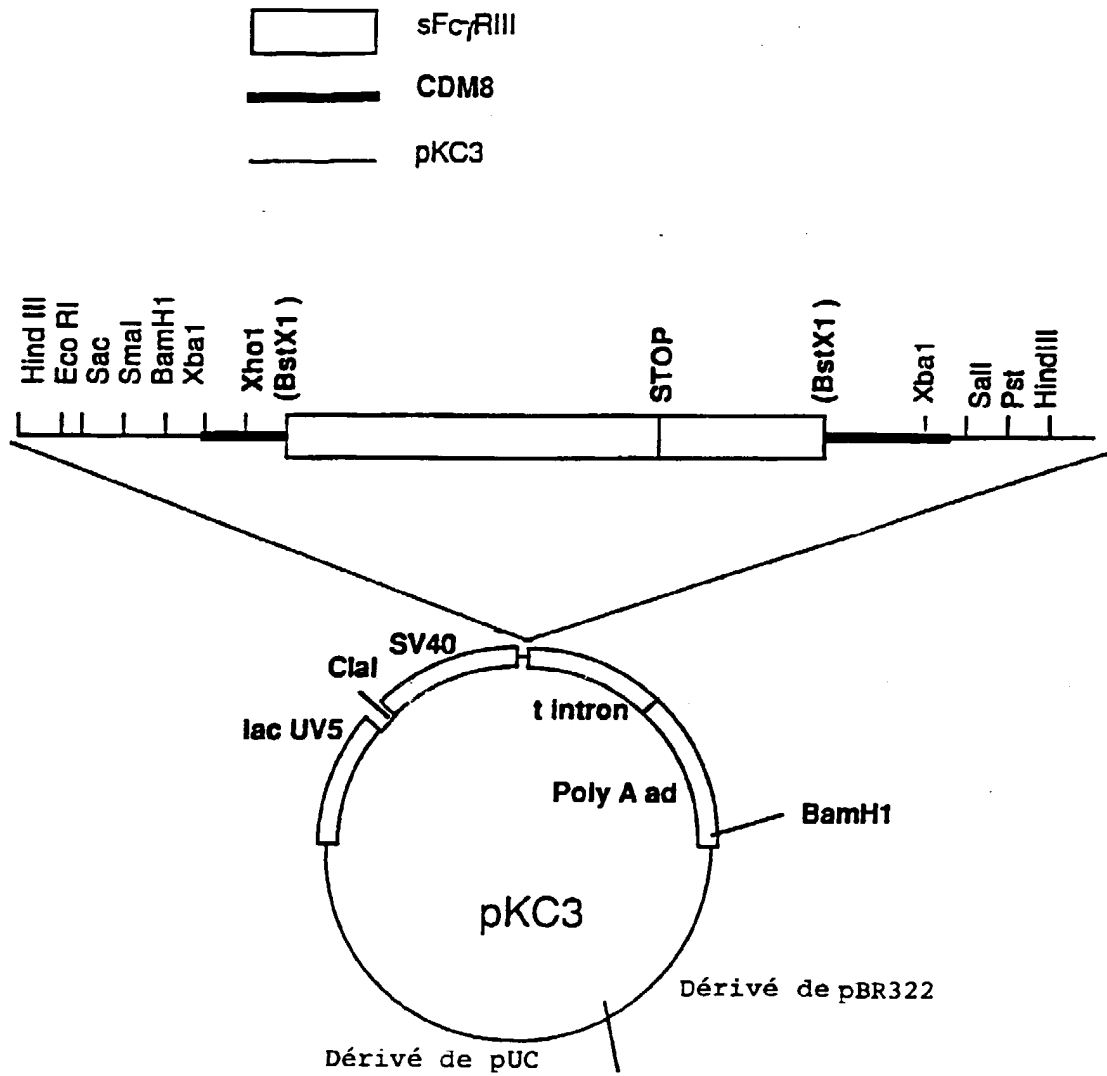


FIGURE 1

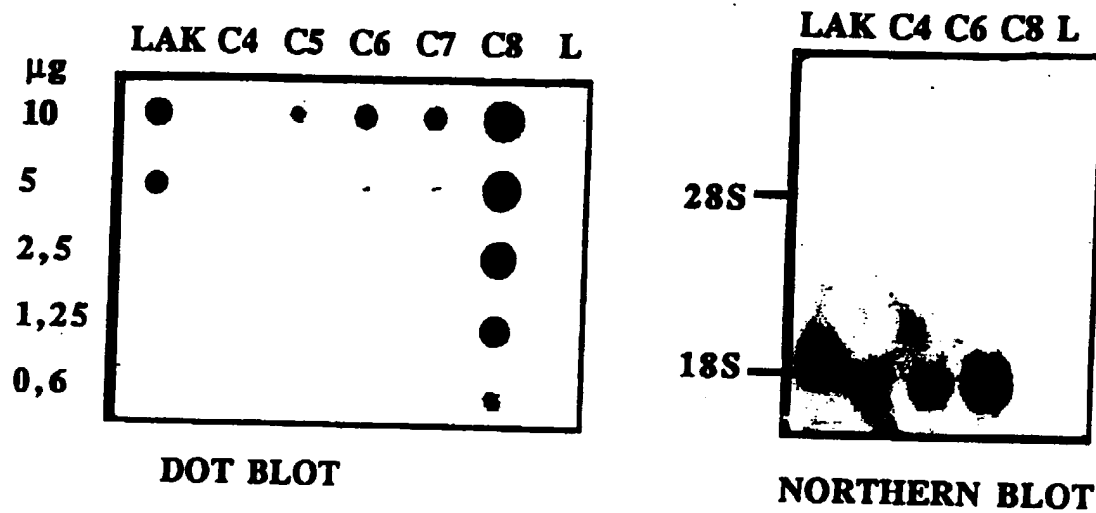


FIGURE 2

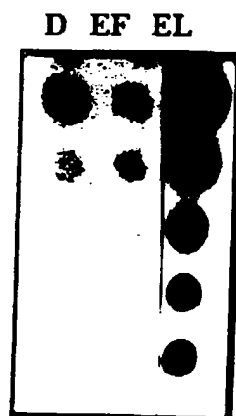


FIGURE 3



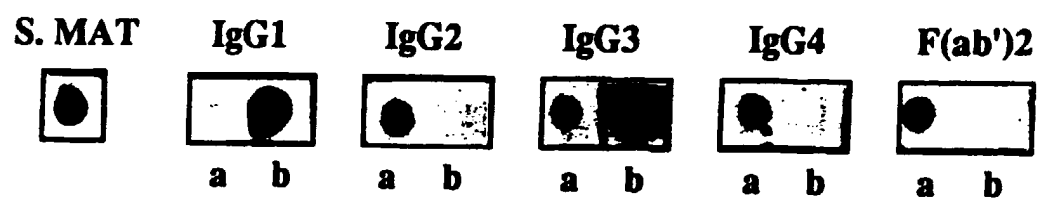


FIGURE 4

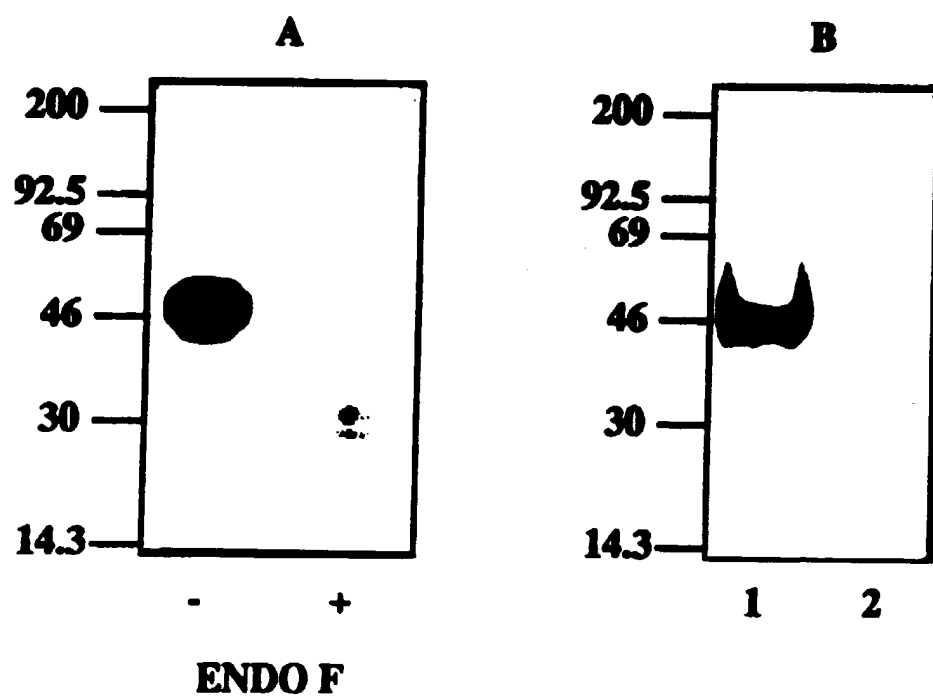
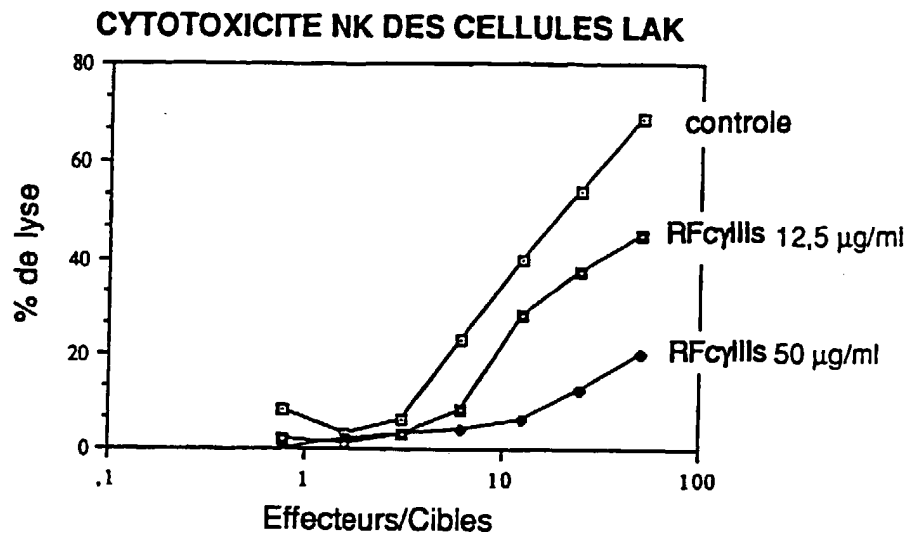


FIGURE 5

A



B

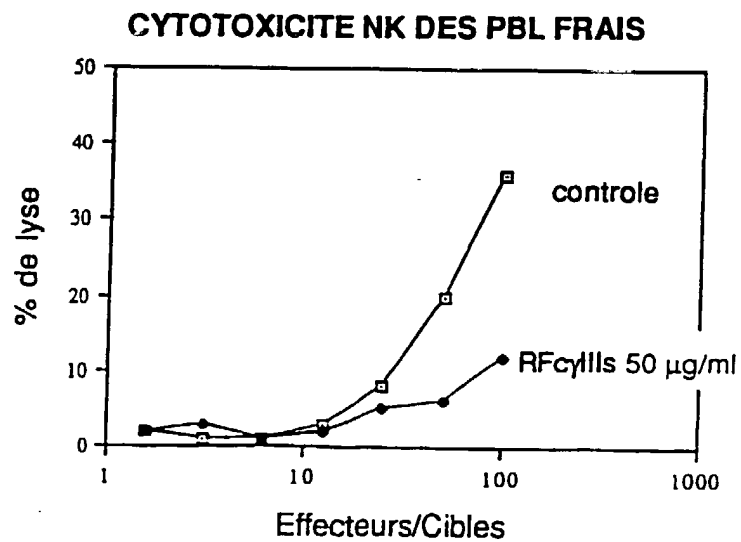


FIGURE 6



Office européen  
des brevets

# RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande  
EP 94 40 0492

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.5)
D,X	EP-A-0 343 950 (SCHERING BIOTECH CORPORATION) * le document en entier *	1-11, 14-18	C12N15/12 C07K13/00 C12N15/85 C12N5/10
X	WO-A-91 08301 (UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE ET AL.) * revendications *	1-12, 14-18	C12P21/08 C12P21/02 G01N33/577 A61K37/02
X	WO-A-88 06733 (D. KHAYAT) * revendications *	1-6, 12-18	
X	HYBRIDOMA vol. 11, no. 4, Août 1992, NEW YORK, ETATS-UNIS pages 447 - 459 R. MOUAWAD ET AL. 'Antibodies raised against peptide fragments of CD16 reacting with membrane and soluble form of CD16. I: Production and characterization.' * abrégé *	1-13	
Y	IMMUNOBIOLOGY vol. 185, no. 1-4, Août 1992, STUTTGART, ALLEMAGNE pages 207 - 221 C. SAUTÈS ET AL. 'Soluble Fcγ <sub>1</sub> (sFcγ <sub>1</sub> ): Detection in biological fluids and production of a murine recombinant sFcγ <sub>1</sub> biologically active in vitro and in vivo.' * abrégé *	1-11, 14-18	C12N C07K C12P G01N A61K
---			
-/-			
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche <b>LA HAYE</b>		Date d'achèvement de la recherche <b>6 Juin 1994</b>	Examineur <b>Nooij, F</b>
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : artère-plus technologique O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ... &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>	

EPO FORM 1500 (04/92) (FR/GB)



Office européen  
des brevets

# RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande  
EP 94 40 0492

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.C.I.S)
D,Y	NATURE vol. 333 , 9 Juin 1988 , LONDRES, GRANDE BRETAGNE pages 568 - 570 D. SIMMONS ET AL. 'The Fcgamma receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein.' * abrégé * * figure 3 *	1-11, 14-18	
A	MEDICAL SCIENCE RESEARCH vol. 19, no. 7 , 1 Avril 1991 , BARKING, GRANDE BRETAGNE page 227 R. ABLIN 'Some implications of the immunoregulatory effect of soluble Fc-gamma receptor III (CD16).' * le document en entier *	14-18	
A	BLOOD vol. 79, no. 10 , 15 Mai 1992 , NEW YORK, ETATS-UNIS pages 2721 - 2728 H. FLEIT ET AL. 'A soluble form of FcgammaRIII is present in human serum and other body fluids and is elevated at sites of inflammation.' * abrégé *	12,13	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 6 Juin 1994	Examinateur Nooij, F
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>----- &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>	
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>			

EPO FORM 1503 (01.92) (PUBLIÉ)